

# BÍRÁLÓI VÉLEMÉNY

Fuxreiter Mónika „A specifikus DNS felismerés molekuláris mechanizmusai”  
c. MTA doktori értekezéséről

Fuxreiter Mónika doktori értekezésének tárgya a DNS szekvenciák specifikus felismerésében szerepet játszó molekuláris tényezők feltérképezése, a molekuláris dinamika funkcionális tulajdonságokra gyakorolt hatásának feltárása. A DNS-hez specifikusan kapcsolódó fehérjék alapvető biológiai folyamatokban játszanak meghatározó szerepet. Rendkívül fontos minden olyan új eredmény és felismerés, amely hozzájárul DNS – fehérje kölcsönhatás molekuláris mechanizmusának jobb megértéséhez. Nyilvánvaló tehát, hogy a választott kutatási téma időszerű és jelentős tudományos érdeklődésre tart számot. A szerző vizsgálatait elsősorban számítógépes módszerekkel végezte, korszerű és sokrétű metodikai repertoárt alkalmazott, mint pl. *ab initio* kvantumkémiai számítások, molekula dinamikai szimulációk, nagykanonikus Monte Carlo módszer, alacsony felbontású fehérje-feltekeredés szimuláció, valamint különféle bioinformatikai eljárások. A disszertáció magas színvonalú kutatómunkát tükröz, amelyet a kreativitás és magabiztos szakmai tudás jellemez.

A doktori mű nem hagyományos formában íródott, hanem a téziszűzet anyagát és a hozzá szorosan kapcsolódó közlemények másolatát tartalmazza. Téziseket írni nehéz mesterség, nem könnyű jól eltalálni az összhangot a tömörség, a világos, de ugyanakkor tudományosan is precíz megfogalmazás között, s mindemellett ügyelni kell arra is, hogy az igazán fontos felismerések kiemelt hangsúlyt kapjanak. Kár, hogy ezeket a követelményeket a Jelöltnek sem sikerült maradéktalanul kielégítenie. Az összefoglalót elolvasva a bírálóban a katarzis élmény elmaradt, pedig lehetett volna, hiszen vannak nagyszerű eredmények, de ezek elsikkadnak a kevésbé jelentősek között. Szerencsésebb lett volna a disszertációban bővített formában bemutatni a téziszűzetben leírtakat. Ez segíthetett volna az árnyaltabb értelmezésben, az igazán fontos és kevésbé lényeges felismerések megkülönböztetésében, az eredmények jelentőségének és a tudományos gondolkodásra gyakorolt hatásának elemző bemutatásában.

Az értekezés alapját 15 rangos nemzetközi folyóiratokban publikált tudományos közlemény képezi, amelyek zömében a Jelölt terminális szerző. Érdemes megemlíteni, hogy még 13 másik kapcsolódó közleménynek is társszerzője, amelyek olyan neves folyóiratokban jelentek meg, mint pl. a *Journal of the American Chemical Society*, *Journal of Molecular Biology*, vagy *Biochemistry*. Az impozáns publikációs lista is jelzi, hogy Fuxreiter Mónika nemzetközi szinten is jelentős eredményeket ért el a DNS felismerés molekuláris alapjainak tisztázásában, s tudományos munkásságának eredményessége messzemenően megfelel a doktori követelményeknek. Legfontosabb eredményei a következők:

Számításai alapján értelmezte a PD..D/ExK típusú restrikciós endonukleázok katalitikus oldalláncainak illetve az aktív centrumban elhelyezkedő fémionok szerepét, és ennek alapján modellt dolgozott ki a katalitikus reakció mechanizmusának leírására. *Ab initio* kvantumkémiai számítások segítségével magyarázta a kétértékű fémionok szerepét a specifikus DNS felismerésben. Monte Carlo számításokkal jellemezte a kötött vízmolekulák eloszlását a BamHI enzim hasítási helye körül a DNS célszekvenciában, amelynek alapján javaslatot tett a „hidratációs ujjlenyomat” modelljének bevezetésére. Molekuláris dinamikai szimulációk segítségével összehasonlítva az ép és a hibás

bázispárt tartalmazó DNS láncok dinamikus tulajdonságait megmutatta, hogy a sérült szekvenciák könnyebb deformálhatósága megnöveli a hibás bázis kifordulásának valószínűségét. Ennek alapján modellt dolgozott ki a DNS hibák felismerésének általános mechanizmusára. Alacsony felbontású szerkezeti szimuláció alkalmazásával következtetett a rendezetlen N-terminális régió szerepére a homeodomének szerkezetének kialakításában és specifikus DNS felismerésben. A szakirodalomban rendelkezésre álló adatok alapján a bolyhos fehérje-DNS komplexek sajátosságait elemezve javaslatot tett a kötődés lehetséges mechanizmusaira, amelyek révén a távoli rendezetlen régiók befolyásolhatják a DNS kötés affinitását és specifitását, s rámutatott, hogy a rendezetlen régiók módosításával a DNS kötés finomhangolását lehet elérni, valamint jellemezte a bolyhos komplexek szövet-specifitásban játszott szerepét. Javaslatot tett a „Dinamikus DNS olvasás” modelljére, ami felhívja a figyelmet a távoli, dinamikus fehérje szakaszok szerepére a specifikus DNS felismerésben, és lehetővé teszi számos korábbi kísérleti tapasztalat molekuláris értelmezését.

A felsorolt eredményekkel a Jelölt jelentősen gyarapította az általa művelt tudományterületet.

A dolgozattal kapcsolatban az alábbi kritikai észrevételeim és kérdéseim vannak:

- A „Célkitűzések” rész elég eklektikus, amely meglehetősen eltérő súlyú és jelentőségű feladatok kavalkádját tartalmazza. Hiányzik egy egységes keretbe foglalás. Bár elég nyilvánvaló, hogy a célkitűzések az eredmények alapján lettek megfogalmazva, olykor még sincs megfelelő összhang a célkitűzések és az elért eredmények között. Pl. a 4. célkitűzés: *„A katalízis és a DNS-kötés kapcsolata, szerepe a restriktív enzimek szelektivitásában”*. Ez egy nagyon általános célkitűzés, ami 4. tézispontban leírt speciális egyedi eset vizsgálata alapján aligha teljesíthető.

Hasonlóképpen a 7. célkitűzés: *„A határfelületi víz szerepének magyarázata a specifikus DNS felismerésben”*. Az erre reflektáló 7. tézispont teljesen általánosan fogalmaz, holott a csatolt cikk szerint csupán a BamHI esetében történt a szimuláció, s ott is csak egyetlen szekvencia variáns lett összehasonlítva a specifikus szekvenciával. Kérdéses, hogy egyetlen egyedi eset vizsgálata alapján mennyire megalapozott általános következtetést levonni és modellt felállítani. Jó lett volna több példával és kísérleti eredményekkel is alátámasztani a hipotézist.

*Kérdés:* Vajon egyéb restriktív enzimek esetében is igaz-e, hogy a hasítóhely környékén lazábban és ritkábban kötődnek a vízmolekulák a nemspecifikus régiókhoz képest? Rendelkezésre állnak-e ezt alátámasztó kísérleti megfigyelések?

- A Jelölt munkáját elsősorban elméleti módszerekkel, számítógépes eljárásokkal végezte. Ezek a módszerek azonban természetüknél fogva számos leegyszerűsítést és közelítést tartalmaznak, ezért a kapott eredmények értelmezésénél fontos a kellő elővigyázatosság és a kísérleti megerősítés. A bíráló több helyen is óvatosabb fogalmazást tartott volna indokoltnak: az *igazoltuk/megállapítottuk/megmutattuk* helyett inkább az *eredményeink azt valószínűsítik*, illetve a *számításaink arra utalnak* kifejezések használata helyesebb lett volna.

Pl. a 12. tézispontban az áll, hogy *„A rendezetlen N-vég jelenléte csökkenti a kötési szabadentalpiát. A teljes, valamint az N-vég nélküli homeodomén kötődésének termodinamikáját elemezve kimutattuk, hogy ezért nagyrészt a hidrofób effektus a felelős.”*

Valójában az elvégzett szimulációk a teljes és az N-vég nélküli homeodomén esetén a szabadentalpiában csupán minimális különbséget mutattak, ami azért sem tekinthető nyomós érvenek, mert a számítások alapján kapott szabadentalpia értékek (-1.7/1.8 kcal/mol) a kísérleti adatoktól (-11.4/13.0 kcal/mol) drasztikusan eltérnek. A kötődés során a vízmolekulák felszabadulásából eredő hidrofób effektus becslés révén történő figyelembevételével jelentősen kisebb (-23.0/26.0 kcal/mol) szabadentalpia értékeket kaptak, ami egyértelműen jelzi a hidrofób effektus fontos szerepét. De a Privalov és munkatársai által kalorimetriával meghatározott kísérleti adatok (Tóth-Petróczy és mts., 2009; Table 1) azt mutatják, hogy a kötési szabadentalpia csökkenéséért alapvetően az entalpiikus járulékok (-2.9 vs. -1.7 kcal/mol) felelősek, ellentétben a tézispont állításával. Ez az eset is azt mutatja, hogy az elméleti számítások segíthetnek a kötődés hátterében álló molekuláris folyamatok azonosításában, a tendenciák felismerésében, de a kapott eredmények értelmezése fokozott óvatosságot kíván.

*Kérdés:* A hidrofób effektus figyelembevétele során a vízmolekulák DNS felszínéről való eltávolításának entalpia járuléka miért nem tükröződik a Tóth-Petróczy és mts. (2009) cikk 1. táblázatának adataiban?

*Apróbb hiányosságok:*

- Az értekezés alapját 15 közlemény képezi, a téziszűzetben mégis 16 került felsorolásra.
- Jelentősen megkönnyítette volna az olvasó tájékozódását, ha a disszertáció végén található közlemények legalább a felsorolásuk sorrendjében lennének csatolva.
- Helyenként a disszertáció nem kellő körültekintéssel megfogalmazott kijelentéseket tartalmaz:  
2. oldal közepe: „... a fehérje eltávolítja a partnert a kötőzsebből.”  
2. oldal alja: „Mivel a lineáris diffúzió Brown mozgás jellegű és így kitüntetett irányultsága nincs, a fehérje nem tud a teljes DNS szál mentén végighaladni.” A fehérje nem azért nem tud a teljes DNS szál mentén végighaladni, mert a Brown mozgásnak nincs kitüntetett irányultsága. A kölcsönhatás energetikai viszonyai szabják meg, hogy átlagosan mennyi ideig van a fehérje a DNS-sel kontaktusban. Irányított mozgás esetén nyilván jóval hosszabb lenne a végigpásztázott szegmens, de még ebben az esetben sem volna arra esély, hogy a fehérje a teljes DNS szál mentén végighaladjon.  
15. oldal: „A hibás DNS megnövekedett flexibilitása következtében a bázis kifordulásának gátja a hibás szekvenciák esetében annyira lecsökken, hogy összemérhetővé válik a fehérje haladási sebességével a DNS-en.” Egy energiagátat nyilván nem lehet közvetlenül a fehérje haladási sebességével összevetni.
- Sokszor zavaró a (szak)szavak egybe- és különírásával kapcsolatos bizonytalanság. Pl. ily módon (helyesen: ily módon), alap-pillér (alappillér), rák-ellenes (rákellenes), szerkezet-meghatározás (szerkezetmeghatározás) stb.

*Egyéb kérdés:*

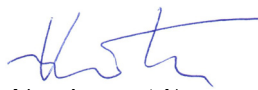
A bolyhos fehérje-DNS kölcsönhatás esetén javasolt lehetséges mechanizmusok megfigyelhetők-e a bolyhos fehérje-fehérje kölcsönhatások esetén is? Esetleg ismertek voltak-e ezek már korábban is?

A fenti észrevételek a dolgozat lényegi részét érdemben nem befolyásolják.

***Összefoglalva:***

A disszertáció magas színvonalú kutatómunkát takar, a követelményeknek mind tartalmi, mind formai szempontból megfelel. A Jelölt számos területen járult hozzá a specifikus DNS felismerés molekuláris mechanizmusának jobb megértéséhez. Különösen figyelemre méltó a dinamikus DNS olvasás modellje, ami új alapokra helyezi a DNS fehérje kölcsönhatás értelmezését. Az értekezést a benne foglalt eredmények alapján nyilvános vitára alkalmasnak tartom, az MTA doktora cím odaítélését javaslom.

Veszprém, 2013. augusztus 6.



Vonderviszt Ferenc  
az MTA doktora